

BEST AVAILABLE COPY**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**24615-2024500-10361
Select CR

Logout | Westgate | Search & Searches

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

The Delphion Integrated ViewGet Now: PDF | More choices...Tools: Add to Work File: Email this to a friendView: INPADOC | Jump to: Top Go to: Derwent**JP02039896A2: LOW-MOLECULAR PEPTIDE COMPOSITION AND PRODUCTION THEREOF**

Derwent Title: Low molecular peptide compsn. - obt'd. by hydrolysis of protein aq. soln. with endo-peptidase and di:peptidyl carboxy:peptidase [Derwent Record]

Country: JP Japan

Kind: A (See also: JP06030615B4)Inventor: OKADA SHIGETAKA;
NAGAMORI YOICHI;
FUJISHIMA NOBORU;Assignee: EZAKI GLICO CO LTD
News, Profiles, Stocks and More about [this company](#)

Published / Filed: 1990-02-08 / 1988-07-27

Application Number: JP1988000187281

IPC Code:

C12P 21/06; A23J 3/34; A61K 37/18; C12N 9/48; C12P 21/06; 1988-07-27 JP1988000187281

Priority Number:

Abstract:

PURPOSE: To improve absorption in intestinal tracts and nutrient effects by hydrolyzing an aqueous solution of a protein with an endopeptidase and dipeptidyl carboxypeptidase(DPCP).

CONSTITUTION: A culture obtained by culturing *Bacillus subtilis* HL521, strain, etc., is extracted and purified to afford DPCP having the following properties. Action; liberating peptides in dipeptide units of amino acids from the carboxy terminals of proteins. Optimum pH; 6.0-11.0. Action temperature; about 50°C. Molecular weight; 11000 measured by a gel filtration method, etc. Endopeptidase, a proline-specific endopeptidase, derived from *Flavobacterium*

BEST AVAILABLE COPY

meningosepticum, etc., and the above-mentioned DPCP are then added to an aqueous solution of soybean protein, etc., to carry out hydrolytic reaction at 25-60°C for 8-72hr and afford a hydrolyzed solution. The resultant hydrolyzed solution is subsequently purified to produce a low-molecular peptide composition having ≤ 1000 molecular weight.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

② INPADOC

Legal Status:

③ Family:

None

[Get Now: Family Legal Status Report](#)

Show 2 known family members

④ Other Abstract

DERABS C90-087124 DERCC90-087124

Info:



[Nominate this for the Gallery...](#)



THOMSON

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-39896

⑤Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 平成2年(1990)2月8日
C 12 P 21/06		6712-4B	
A 23 J 3/34		7236-4B	
A 61 K 37/18		8615-4C	
C 12 N 9/48		7823-4B	
//(C 12 P 21/06			
C 12 R 1:125)			
(C 12 P 21/06			
C 12 R 1:07)			
(C 12 N 9/48			
C 12 R 1:125)			

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全4頁)

④発明の名称 低分子ペプチド組成物及びその製造方法

②特 願 昭63-187281

②出 願 昭63(1988)7月27日

⑦発明者 岡田茂孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269
 ⑦発明者 長森陽一 大阪府大阪市阿倍野区美章園2丁目11-1
 ⑦発明者 藤嶋昇 大阪府大阪市生野区生野東4丁目6-38
 ⑦出願人 江崎グリコ株式会社 大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

BEST AVAILABLE COPY

明細書

1. 発明の名称

低分子ペプチド組成物及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

- ① タンパク質の水溶液をエンドペプチダーゼとジペプチジルカルボキシペプチダーゼ（以下、DPCPaseと略記する）によって加水分解することを特徴とする低分子ペプチド組成物。
- ② タンパク質の水溶液にエンドペプチダーゼとDPCPaseとを添加してこれを加水分解することを特徴とする低分子ペプチド組成物の製造方法。
- ③ エンドペプチダーゼとしてプロリン特異的エンドペプチダーゼを使用することを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。
- ④ 加水分解の条件として温度25～60℃、8～72時間とすることを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。
- ⑤ エンドペプチダーゼとして通常のエンドペプ

チダーゼとプロリン特異的エンドペプチダーゼとを併用することを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。

3. 発明の詳細な説明

① 産業上の利用分野

本発明は、ジペプチドを主成分とする低分子ペプチド組成物を酵素化学的に製造するものである。

② 従来の技術及び課題

腸管におけるタンパク質の吸収は、タンパク質が胃や腸のペロテアーゼでオリゴペプチドにまで分解された後、腸管上皮細胞のペプチダーゼで更に分解されて吸収されると考えられている。それゆえジペプチドやトリペプチドの吸収はアミノ酸に比べて非常に早期に行われるという報告もあり、これによればアミノ酸よりジ又はトリペプチドの方がより好ましいことになる。

従来、ジペプチドの製造方法は有機合成化学的な方法で行われている。しかしながら、この方法では、コストが高くつく上に副生物の除去が困難

であり、食品としての安全性にも問題があった。また、各種の市販プロテアーゼ剤をタンパク質に作用させても良いが、この場合酵素剤中に含まれるペプチダーゼによりアミノ酸化されることが多い。たとえば、アスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) の酵素剤もアミノ酸生成性が強く、これによる大豆タンパク質分解物中のアミノ酸は40%にも及んでいる。

本発明は、有用なジおよびトリペプチドを主体とするペプチド混合物及びその新製造法に関するものである。

③ 課題を解決するための手段

本発明は D P C Pase を有効に作用させジおよびトリペプチドを大量に生産することを目的にしている。更に具体的にいえば、D P C Pase とエンドペプチダーゼおよび場合によってはプロリン特異的エンドペプチダーゼを共存させタンパク質を分解する点にある。まず D P C Pase についてのべる。

D P C Pase は、たとえばバチルス ズブチリ

ス (*Bacillus subtilis*) HL 521 株 (微研菌寄託第10005号) 又はバチルス ブミルス (*Bacillus pumilus*) HL 721 株 (微研菌寄託第10006号) を通常の培養法により培養して生成させることができるものである。なお、その D P C Pase の性質は次の通りである。

I) 作用

本酵素を Ala-6 (アラニン 6 個よりなるペプチドを Ala-6 と略記し、同様に例えばアラニン 2 または 3 個よりなるものを Ala-2, Ala-3 のごとく略記する。以下同じ) に作用させるとカルボキシ末端より Ala-2 づつに切断するほか、アンジオテンシン I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) のカルボキシ末端から His-Leu を遊離する。また、ラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) を Arg-Pro-Pro, Gly-Phe, Ser-Pro, Phe-Arg に分解した。すなわち、本酵素はタンパク質のカルボキシ末端よりアミノ酸の種類の如何を問わずジペプチド単位

でペプチドを遊離する。しかしながら、カルボキシ末端より 2 番目にプロリンがあった場合は切断しない。

II) 至適 pH 及び安定 pH

バチルス ズブチリス HL 521 株のものは、pH 6.0 - 11.0 の間で安定であり、至適 pH は、7.5 である。

バチルス ブミルス HL 721 株のものは、pH 5.5 - 9.0 の間で安定であり、至適 pH は 7.5 である。

III) 作用温度

バチルス ズブチリス HL 521 株、バチルス ブミルス HL 721 株共に酵素の作用最適温度は 50°C で、pH 7.0, 60 分処理を条件として 45°C まで安定であった。

IV) 分子量

ゲル通過法により、バチルス ズブチリス HL 521 株のものは、110,000 バチルス ブミルス HL 721 株のものは、155,000 であった。

V) 活性測定方法

1.0 mM ベンゾイルグリシル-アラニル-プロリン 0.1 mM に 2.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.05 mL と酵素液 0.05 mL を加え、40°C で 15 分反応させ、生ずるアラニル-プロリンをニンヒドリン法で定量した。

上記反応で 1 分間当たり 1 μmole のアラニル-プロリンを生成する酵素量を 1 単位とした。

以上はバチルス ズブチリス及びバチルス ブミルスの例であるが、本願においては必ずしもこれらに限定されない。たとえば、上記以外にもウサギの肺に由来するもの、ブタの腎臓、エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*)、コリネバクテリウム イクイ (*Corynebacterium equi*) 等の起源のものも本願においてやはり有効に利用できるものである。

次にエンドペプチダーゼであるが、このものはプロリン特異的エンドペプチダーゼを除いて通常のエンドペプチダーゼが採用される。オリゴペプチドを大量に生成し、かつアミノ酸を余り生成し

ないものがよい。プロリン特異的なエンドプロテアーゼの起源もフラボバクテリウム メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) のほか、たとえば羊の腎臓由来の如きも使用できる。

エンドペプチダーゼも D P C Pase も共に作用温度、作用時間、使用量(力値)、pH 等において格別制限はない。その作用可能範囲内において適宜に定めればよい。

エンドペプチダーゼ、プロリン特異性エンドペプチダーゼ及び D P C Pase の作用順序も任意であるが、一般的にはエンドペプチダーゼ、プロリン特異的エンドペプチダーゼ、D P C Pase の順に作用させるのが普通である。

なお、基質であるタンパク質はその起源、品種等を問わずにいずれも採用される。たとえば大豆タンパク質、小麦タンパク質、乳タンパク質又は卵白などである。

④ 作用

バチルス ズブチリス及びバチルス プミルス

の産生する D P C Pase は本発明者によってカルボキシ末端からアミノ酸 2 個単位で作用しジペプチドを生成することが明らかになった。すなわち、前述の③課題を解決するための手段の項において酵素の作用として述べたように Ala-6 を 3 個の Ala-2 に、ラジキニンを 3 個のジペプチドと 1 個のトリペプチドに切断する。しかし、アンジオテンシン I の例にみられるようにカルボキシ末端より 2 番目にプロリンが存在すると反応は進行しない。このことは、Ala-Ala-Pro-Ala に作用しないことからも一般的性質といえる。

この反応の阻害を克服するため本発明者は種々検討の結果フラボバクテリウム メニンゴセプチカムに代表されるプロリン特異的エンドペプチダーゼを共存させまたは予め作用させると再び D P C Pase の作用が始まることを見出した。

上記のように D P C Pase とプロリン特異的エンドペプチダーゼを共同作用させれば理論上は蛋白質をすべてジペプチドに分解することができる。しかし実際に各種のペプチドやカゼインなどの高

分子タンパク質に作用させるとペプチドに比べ著しく作用が劣り、場合によってはほとんど作用しない。この原因について種々検討を行ったところ、エンドプロテアーゼを作用させ、オリゴペプチド化した後、D P C Pase ならびにプロリン特異的エンドペプチダーゼを作用させると効率よくジおよびトリペプチドが生成することが判明した。

⑤ 実施例

実施例 1

1% ベブトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 食塩を含む培地を pH 7.3 に調整し、殺菌後バチルス ズブチリス H L 521 株を接種し、37℃・16 時間培養する。培養後、遠心分離により菌体を得、10 mM リン酸緩衝液で懸濁し超音波で菌体を破碎した。さらに遠心分離により固体破砕物を除去した。

上澄液には D P C Pase 0.03 U/mℓ を含んでいた。この上澄液を Q-セファロース、ハイドロキシルアバタイト、TSK-gel G 3000 SW X などの各種クロマトグラフィーにより精製

した。得られた精製酵素はゲル電気泳動によって单一のタンパク質の挙動を示した。収率は約 1% であった。

実施例 2

バチルス プミルス H L 721 株を実施例 1 と同組成の培地で同一条件にて培養した。同様の精製条件にて同様の作用を示す酵素を得ることができた。収率は 1.5% であった。

実施例 3

1 g のオボアルブミンを 100 mℓ の水に溶解しバチルス ズブチリスのエンドペプチダーゼ 0.1 g を加え 40℃・4 時間作用させた。100℃ に加熱しエンドペプチダーゼを失活させた後、プロリン特異的エンドペプチダーゼ 5 U を加え 40℃ 16 時間作用させた。100℃ に加熱しプロリン特異的エンドペプチダーゼを失活させた後、D P C Pase 0.5 U を加えさらに 40℃ で 16 時間反応させた。

それぞれの段階に於ける反応物のゲル通過法による分子量の割合を表 1 に示す。

表1 基質の分解度

供試材料採取時期	基質の分子量	
	1000以上	1000以下
エンドペプチダーゼ 作用後	70%	30%
プロリン特異的 エンドペプチダーゼ 作用後	50%	50%
D P C Pase 作用後	5%	95%

以上のように分子量1000以下の低分子量のペプチドを主成分とする組成物を得ることができた。

③ 本発明の効果

本発明に使用の酵素の特異性から、本発明の低分子組成物は、ジペプチドを主成分とするので、経口投与した場合、腸管において速やかに吸収されやすいものであり、栄養的にみてすぐれたものである。

特許出願人 江崎グリコ株式会社